西北农业学报 2005, 14(1): 10~12
Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica

提高棉花花粉管通道法转化率的研究[20]

马 盾, 黄乐平, 黄全生, 孟庆玉, 危晓薇, 陈勋基, 美丽古丽
(新疆农科院核技术生物技术研究所, 乌鲁木齐 830091)

摘 要: 针对棉花不同受体材料、果台、棉铃大小、注射时间以及操作技术的研究,逐步总结出一套适合于新疆的实用操作方法。使外源 DNA通过花粉管通道导入技术得到了不断提高,注射棉铃未落铃率平均达到25%以上,最高达到 56%,大大提高了外源 DNA的转化率,获得了针对性强的高表达率转化棉花植株。

关键词: 棉花; 花粉管通道法; 转化率
中图分类号: S562 文献标识码: A 文章编号: 1004-1389(2005)01-0010-03

Study on Improvement of Pollen Tube Pathway Transformation Efficiency Through Field Concrete Operation

MA Dun, HUANG Le-ping, HUANG Quan-sheng, MENG Qing-yu, WEI Xiao-wei, CHEN Xun-ji and Meiliguli
(Institute of Nuclear and Biological Technologies, Xinjiang Academy of Agricultural Sciences, Urumqi Xinjiang 830091, China)

Abstract Cotton is big embryo sac plant with multiembry, using pollen tube pathway transfer exogenous DNA, one flower can get many seeds. After many years systematic studying and grouping in field, taking different breed variety and different fruit spur and advanced transfer technique, a useful and economic transfer method was got. The transformation efficiency of exogenous DNA was gradually improved. The transferred boll's rate of existing can up to 25 percent, some can up to 56 percent. Many high expression plants were acquired.

Key words Cotton; Pollen tube pathway; Rate of transfer

与其他转基因技术不同,花粉管通道法有效地利用植物生殖受精过程,避开了植株再生组织培养难题,在转导过程中不受物种间的隔离限制,可将不同种植物、动物、微生物中的抗病、抗虫、抗除草剂、抗逆、提高品质、丰产、降低含糖量、伸长纤维蛋白等外源 DNA导入到受体植物生殖器官中,操作方便简单,转化成本较低,可进行大量转化。但该方法不足之处在于转化技术还不太完善,转化机理研究还有欠缺,转基因注射的操作过程有一定盲目性,转化效率有待于进一步提高等。根据新疆棉花的生长特点及特殊的生态环境,通过几年的系统研究和摸索,经过田间大量实际操作,技术手段操作方法得到了逐步改进和提高,形成了一套适合新疆棉区的花粉管通道转 DNA操作技术,使注射棉铃未落铃率平均达到 25%以上,最高达到 56%,大大提高了外源 DNA的转化率,获得了针对性强的高表达率转化棉花植株。

1 材料与方法

1.1 材料

供转导的外源基因为 GHABC1基因、HAN基因。受体材料为新陆早 7、8、10、17号、HB-1等新疆主栽的陆地棉和长绒棉品种。

[20]收稿日期: 2004-01-06 修回日期: 2004-11-10
基金项目: 新疆维吾尔自治区自然科学基金资助项目。
作者简介: 马 盾(1960-),男,山西祁县人,副研究员,在读硕士,主要从事棉花转基因育种、作物栽培等研究工作。
电话: (0991)4507186, E-mail: madun12700@163.com.

1.2 外源 DNA花粉管通道导入方法

1.2.1 幼铃及果台选择　选择花色正常,棉铃变异较小的植株。从受体材料花冠膨大到开花直到花由白色变为粉红色 (一般为 20 h)后开始转导。田间操作时在受体材料开花后,一般从第 2果台开花到第 6果台开花期间进行转导,此时的气候、土壤等环境条件最佳,转导时间一般为 10~ 15 d,每注射一个棉铃,对此棉铃就要作一个标记,标记的颜色要鲜亮,便于田间寻找记载,注意不同外源基因,应采用不同颜色标记。

1.2.2 剥花方式　将花冠连同雄蕊、柱头、花柱一起摘除,仅剩裸露完整的幼铃和包叶,花柱要从幼铃顶部断下,使伸入幼铃的花柱与幼铃顶端平齐,具体操作方法为双手协调进行,一只手在下端将幼铃固定,另一只手抓紧花冠,包括其中的雄蕊、柱头、花柱,左右轻晃,慢慢地拔起,切勿损坏幼铃、包叶或留下伤痕,如有损伤 (幼铃顶端最易损坏)应放弃此铃的注射。

1.2.3 注射器 (微量进样器)的选择　针头应尽量细,与进入幼铃的花柱相比,针头的粗细应是其的 1/2~ 1/3为宜,针头长度在 3 cm左右,针管上的刻度明显,可全方位观察,针管容量以 50μL为宜,适合于室外操作,针管的长度应在 8 cm左右,注射器总长不超过 15 cm,便于操作,将质粒准确无误地注射进幼铃而不损伤子房、子房壁、子房座等,是注射技术的关键。

1.2.4 注射方式及注射速度　双手协调进行,一支手在下面握稳幼铃,另一支手持注射器,将针头顺花柱的方向和方位扎入幼铃,大约 0.2~ 0.3 cm,然后向外退出 0.05 cm,在针头前形成一定空间,容纳质粒,注意针头不能损伤子房壁、子房室、子房座以及扎入过深,针头扎入 0.2 cm(1级损伤)时,棉铃脱落较少,当针头扎入 0.3 cm(2级损伤)、0.4 cm(3级损伤)、0.5 cm(4级损伤)时棉铃脱落显著提高,影响转基因棉铃的座铃率。

1.2.5 注射时间的确定　新疆地区种植的棉花一般是在早晨 8:00~ 10:00(北京时间)开花最多,花粉粒落到柱头上就会萌发产生花粉管,伸入柱头,通过花柱和子房壁,最后经珠孔进入胚囊发生受精作用,完成整个受精过程大约在开花后 20~ 36 h,因此,转导注射时间一般在开花 20 h后 (花朵颜色变成粉红色 略深粉红色)进行,一旦花色发紫或萎蔫的花不宜操作。值得注意的是花粉管形成和受精过程与气温、光照有着密切关系。

2 结果与分析

2.1 不同铃形及不同果台对作铃率的影响

通过田间观察和筛选,发现个别花冠大,幼铃也大的材料,适合于花粉管注射,根据系统测量:开花时幼铃最宽处直径 0.6 cm以上,高度 0.7 cm以上,尤其是直径在 1.0以上的大幼铃适合于花粉管注射,铃不易脱落,而幼铃最宽处直径小于 0.5 cm,高度小于 0.6 cm的棉花品种花粉管注射后,铃易脱落。当幼铃的直径大时,其花柱也相对较粗,呈正相关,测量表明,进入幼铃处的花柱直径在 0.07 cm以上,易于注射,幼铃不易脱落,而花柱较细,在 0.07 cm以下,尤其是 0.06 cm以下的棉花品种,花粉管注射后,幼铃脱落率较高,由于品种的不同,种植生长环境的不同,对棉花的生殖器官造成影响,使许多幼铃的生长发育不完整,产生畸形,花柱在幼铃中不直,这些都会影响注射的质量,在被注射后一段时间后,一般都会脱落。因此,在注射时,一定要选择生长匀称的标准幼铃,尤其注意伸入幼铃的花柱要垂直,注射损伤小,才能确保较高的成功率。由于 1果台或 6果台以上的花朵,遗传变异较大、畸形、幼铃较小、成熟过早或过晚、气候条件不稳定、土壤养分减少,植株衰老等不利因素,造成落铃率较高,不利于棉铃的转导。从表 1可以看出,第 2、3果台的未落铃率较高,第 4、5果台次之,到第 6果台就很低了。由此可看出花粉管转导应该从开花初期开始中期结束。应尽量选择最宽处直径 0.5 cm以上的幼铃 (开花时)受体材料,最佳为直径在 1.0~ 1.2 cm的大幼铃 (开花时)为受体材料,适合于花粉管注射,棉铃不易脱落。注射时间应在花冠颜色变成粉红色时进行,从第 2果台开花开始至第 5果台开花为最佳注射时期。

2.2 剥花及注射方式对坐铃率的影响

剥花时如果损害了包叶对坐铃率有影响,同时将同一果枝上其他棉铃、幼蕾、花摘除,可提高转基因棉铃的坐铃率。花粉管注射是一项非常精细的工作,需要经验和技巧的积累,熟练程度越高,转基因成功率越高。注射器应具有易于准确注射、刻度明显、携带方便、操作简单等特点,操作时要轻、准、稳,根据幼铃 (开花时)大小注射不同的深度,一般以幼铃高度 3/10为佳 (表 2),在注射时不能太快或太慢,太快易造成质粒的外溢,太慢则造成幼铃过多的损伤,注射速度应匀速推进,保

持从针头出来的液体成滴状膨大即可,注入幼铃 的质粒溶液不外溢为佳。

表 1 转基因未落铃率调查结果

Table 1 The survey result of transgenic efficiency

品种 Varieties	基因 Gene	果台 1	2	3	4	5	6	7	合计 Total	转基因量 Transgenic amount	未落铃率 Boll rate
新陆早 10号 Xinlu zao 10	HAN	13	222	228	109	202	1	0	775	2038	38.03
	成铃率% Boll rate	1.7	28.6	29.4	14.1	26	0.1	0			
新陆早 8号 Xinlu zao 8	HAN	54	140	186	140	117	6	1	644	1694	38.02
	成铃率 % Boll rate	8.4	21.7	28.9	21.7	18.2	0.9	0.2			
新陆早 7号 Xinlu zao 7	GHABCI	37	140	165	122	111	0	0	575	1713	33.6
	成铃率 % Boll rate	6.4	24.3	28.7	21.2	19.3	0	0			
HB-1	GHABCI	37	332	342	173	251	10	1	1146	2021	56.7
	成铃率 % Boll rate	3.2	29.0	29.8	15.1	21.9	0	0			

表 2 转基因田间棉铃脱落情况(打针后 5天开始)记载表

Table 2 Field record of transgenic cotton boll's falling rate (starting after five days of injection)

调查天数 Survey day	自然脱落 Natural dropping 蕾 Bud	铃 Boll	注射损伤造成的落铃 The dropped Cotton boll's by injection 1级 Grade-1	2级 Grade-2	3级 Grade-3	4级 Grade-4	自落 Natural drop	虫咬 Insect bite
5	2	0	1	3	8	3	0	2
7	1	0	6	3	7	8	0	2
9	1	0	4	7	4	8	0	2
11	0	0	8	11	8	10	0	3
13	1	1	7	7	12	13	1	2
15	0	2	9	8	6	10	2	1
17	1	1	6	7	3	6	1	2
19	0	2	4	8	4	5	1	1
合计 Total	6	6	45	54	52	63	5	15
%	2.4	2.4	18.3	22.1	21.1	25.6	2.0	6.1

3 讨论

3.1 在转导过程中温度在 24~ 30℃、阳光充足、相对湿度适中,通道打开的快,可以在早晨 7时开始注射。温度偏低(20℃左右)、阴天、降温天气,湿度偏大(相对湿度 80%以上)或偏小(50%以下),通道打开的慢,注射时间要推迟到下午,等花朵颜色变成粉红色才能进行,适宜的温度和相对湿度为 24~ 35℃和 60%~ 80% ,此条件下外源 DNA转导成功率较高。另外在操作时应选择光线柔和的条件,不能太刺眼或视觉模糊。选择无风或小风时间,尽量减少对操作者的外界干扰,集中精力认真仔细操作,才能达到好的效果。

3.2 转导结束应该注意预防棉田病虫害,确保受体植株正常生长,到开花期时,应重点预防和防治棉铃虫、棉蚜、棉叶螨、盲蝽等害虫,及时足量施花铃肥,叶面肥,按时灌水、中耕锄草、疏枝打顶等常规管理措施,最大限度地减少落蕾、落铃。同时,一定要保证转基因棉铃标牌牢固,不易丢失,字迹清晰不褪色,收获时应做到转基因棉铃,单铃单收,单铃考种,分别棉检,记录转导基因数量及转导铃数量等,以备下个生长季节种植使用。

参考文献:

[1] 周光宇,陈善宝,黄骏麒主编. 农业分子育种研究进展[M]. 北京: 中国农业科技出版社, 1992, 107~ 133.

[2] 吴小月. 外源 DNA导入技术在棉种改良中的应用研究[J]. 中国棉花, 1998, 8(1): 45~ 47.

[3] 西北农学院主编. 作物育种学[M]. 北京: 农业出版社, 1979, 319~ 392.

[4] 姚源松主编. 新疆棉花高产优质高效理论[M]. 新疆科技出版社, 2003, 296~ 299.

[5] 侯学文,曾庆平,郭勇. 转基因植物的一个新标记基因[J]. 生命的化学, 1997, 17(2): 36.

[6] 贾士容. 转基因棉花[M]. 北京: 化学工业出版社, 2002.

[7] 张正林. 培育转基因棉花[J]. 北京: 世界农业, 1993, 114~ 118.

©1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net